

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 20, 1982, pp. 745–752

## Zur Bestimmung der katalytischen Aktivität der Lipase mit Trilinolein als Substrat

Von W. Rick und M. Hockeborn

Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Universität Düsseldorf

(Eingegangen am 3. Februar/9. Juni 1982)

**Zusammenfassung:** Der von *Proelss & Wright* ((1977) Clin. Chem. 23, 522–531) ausgearbeitete Zweipunkttest zur Bestimmung der Lipase wurde auf seine Brauchbarkeit geprüft. Es zeigte sich, daß zwar das Substrat Trilinolein durch Pankreaslipase gespalten wird, ohne daß Leberesterase oder Cholinesterase interferieren; die verwendete Farbreaktion hingegen führt nicht zu reproduzierbaren Ergebnissen. In einem kontinuierlichen UV-Test ließ sich außerdem eine lag-Phase nachweisen, deren Dauer von der eingesetzten katalytischen Aktivität abhängig ist. Aus den genannten Gründen können mit dem Verfahren von *Proelss & Wright* zur Bestimmung der Lipase im Serum keine aussagekräftigen Resultate erzielt werden.

### Determination of lipase with the substrate trilinolein

**Summary:** The applicability of the two point test reported by *Proelss & Wright* ((1977) Clin. Chem. 23, 522–531) for the determination of lipase was investigated. The substrate, trilinolein, is indeed cleaved by pancreatic lipase without interference from liver esterase or cholinesterase; on the other hand, the reported colour reaction gives nonreproducible results. Furthermore, the continuous UV-test showed a lag phase, the duration of which depends on the added catalytic activity. For these reasons the method of *Proelss & Wright* for the determination of lipase in serum does not give diagnostically useful results.

### Einführung

Zur Bestimmung der katalytischen Aktivität der Lipase (Triacylglycerol acyl hydrolase, EC 3.1.1.3) beschrieben *Proelss & Wright* (1) ein Verfahren mit Trilinolein als Substrat und Lipoxxygenase als Hilfsenzym. In der anschließenden Farbreaktion werden die infolge der Oxidation von Eisen(II)-Ionen durch Fettsäure-Hydroperoxid gebildeten Eisen(III)-Ionen als Eisen(III)-thiocyanat bestimmt. Wir prüften diesen photometrischen Zweipunkttest unter Verwendung von gereinigten Enzymen und verschiedenen Seren.

### Material

#### Enzyme

Zu den Untersuchungen wurden die folgenden Enzympräparationen verwendet:

Lipase (Triacylglycerol acyl hydrolase, EC 3.1.1.3), gereinigte Pankreaslipase aus menschlichem Duodenalsaft, spezifische Aktivität 690 U/mg (25 °C) gegen Triolein als Substrat.

Esterase (Carboxylester hydrolase, EC 3.1.1.1), aus Schweineleber, Boehringer Mannheim, Bestell-Nr. 104698, spezifische Aktivität etwa 100 U/mg (25 °C) gegen Buttersäureethylester als Substrat. Ein Teil der Kristallsuspension wurde bei + 4 °C gegen Natriumchloridlösung (9,0 g NaCl/l) dialysiert.

Cholinesterase (Acylcholin acyl hydrolase, EC 3.1.1.8), aus Humanplasma, Boehringer Mannheim, Bestell-Nr. 348643, spezifische Aktivität 9 U/mg (25 °C) gegen Butyrylthiocholiniodid als Substrat.

#### Probenmaterial

Bei den eingesetzten Proben handelte es sich um:

Seren von Gesunden,  
Seren von Patienten mit akuten oder chronischen Pankreaserkrankungen,  
Seren aus Blutproben, die etwa 10 Minuten nach i.v. Injektion von 5000 I.E. Heparin von Gesunden gewonnen wurden,  
Seren, in denen die Pankreaslipase durch zweistündige Inkubation bei 56 °C vollständig inaktiviert worden war; dies wurde im titrimetrischen Test mit Triolein als Substrat nachgewiesen.

#### Reagentien

1. Lipoxxygenase (Linoleate: oxygen oxidoreductase, EC 1.13.11.12) aus Sojabohnen, spezifische Aktivität etwa 153 000 *Theorell*-Einheiten pro mg. Definition dieser Einheit nach *Theorell* et al. (2): Eine Einheit ist diejenige Enzymaktivität, die unter den Testbedingungen (Volumen des Testansatzes 3,0 ml, Wellenlänge 234 nm, Temperatur 25 °C) zu einer Absorptionzunahme von 0,001/min führt. Umrechnung in Internationale Einheiten (U): Spezifische Aktivität etwa 18,4 U/mg.
2. Trilinolein (Glycerin-trilinoleat), etwa 99%, Sigma Bestell-Nr. T-3252.
3. Linolsäure (cis-9-cis-12-Octadecadiensäure), etwa 99%, Sigma-Bestell-Nr. L-1376.



Tab. 1. Modifiziertes Verfahren zur Bestimmung der Lipaseaktivität.

	Probe	Proben-Leerwert	Linol-säure-Standard	Substrat-Leerwert	Reag.-Leerwert
Trilinolein-Emulsion (Lösung 6)	0,5 ml	—	—	0,5 ml	—
Gallensäure-Puffer-Lösung (Lösung 2 bzw. 3)	—	0,5 ml	—	—	0,5 ml
Linolsäure-Standard-Lösung (Lösung 15)	—	—	0,5 ml	—	—
Lösungen auf 25 °C temperieren, im Abstand von 15 s zufügen:					
Probe	10 µl	10 µl	—	—	—
Ansätze sofort gut mischen und unmittelbar danach zugeben:					
Lipoxygenase-Gebrauchs-Lösung (Lösung 8)	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Ansätze sofort gut mischen und 10 min bei 25 °C inkubieren, im Abstand von 15 s zufügen:					
HCl-Alkohol (Lösung 9)	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml
Ansätze sofort gut mischen					
Ammonium-Fe(II)-sulfat-Lösung (Lösung 10)	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Ansätze sofort gut mischen, genau nach 30 s zufügen:					
Ammoniumthiocyanat-Lösung (Lösung 11)	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Ansätze sofort gut mischen, genau nach 3 min photometrieren					

entsprechend

$$\text{Katalytische Aktivität} = \frac{A_P - A_{PL} - A_{SL} + A_{RL}}{A_{St} - A_{RL}} \times 250 \text{ (U/l (25 °C))}$$

Symbole s.o.

## Kontinuierlicher UV-Test mit Trilinolein als Substrat

## Ausführung

Wir führten den kontinuierlichen UV-Test zur Bestimmung der Lipaseaktivität nach dem in Tabelle 2 aufgeführten Schema aus. Die kontinuierliche Registrierung der Absorption erfolgte bei 238 nm im Spektralphotometer Zeiss PMQ II mit angeschlossenen Transmissions-Absorptions-Wandler und Kompensations-schreiber. Die Verwendung von 0,5 cm-Quarzküvetten ist not-

Tab. 2. UV-Test mit Trilinolein als Substrat zur Bestimmung der Lipaseaktivität.

	Probe	Proben-Leerwert	Substrat-Leerwert
Trilinolein-Emulsion (Lösung 6)	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
auf 25 °C temperieren			
Probe	10 µl	10 µl	—
Ansätze sofort gut mischen			
Lipoxygenase-Gebrauchslösung (Lösung 8)	10 µl	—	10 µl
Ansätze sofort gut mischen und in Quarzküvetten von 0,5 cm Schichtdicke überführen			

wendig, da die Substratemulsionen — unabhängig von der Art und Konzentration der eingesetzten Gallensäure — auch in dieser Schichtdicke bereits eine Ausgangsabsorption von etwa 1,5–1,6 zeigen.

## Auswertung

Soweit eine geradlinige Absorptionsänderung beobachtet wurde, ermittelten wir deren durchschnittliche Größe pro Zeiteinheit. Die bei den Proben-Leerwerten durch Trübungsverminderung auftretende Abnahme des Meßsignals wurde jeweils zur Korrektur der Meßwerte der Bestimmungsansätze verwendet.

## Ergebnisse

## Substratspezifität

Im kontinuierlichen titrimetrischen Test (3) fanden sich mit gereinigter Pankreaslipase, Seren von Gesunden und Patienten mit akuter Pankreatitis innerhalb der Fehlerbreite der Methode die gleichen katalytischen Aktivitäten unter Verwendung von Triolein und Trilinolein als Substrat (4). Durch Carboxylesterase aus Schweineleber und Cholinesterase aus Humanplasma wurde Trilinolein ebenso wie Triolein nicht gespalten. Da die Substanz mithin nur durch Lipase umgesetzt wird, sind Methoden mit Trilinolein als Substrat spezifisch für Lipase.

## Originalverfahren nach Proelss &amp; Wright

Da wir bei der Messung der Lipaseaktivität verschiedener Proben nach den Angaben von Proelss & Wright (1) nicht zu reproduzierbaren Ergebnissen gelangten, prüften wir zunächst die einzelnen Schritte des Bestimmungsverfahrens.

## Prüfung der einzelnen Reaktionsschritte

## Bestimmung von Eisen(III)-Ionen als Eisen(III)-thiocyanat

Zur Prüfung der von Proelss & Wright (1) verwendeten Methode zur Bestimmung von Eisen(III)-Ionen

führten wir Versuche mit Standardlösungen von Eisen(III)-chlorid in 0,01 mol/l Salzsäure aus. Lösungen mit 25 bis 1000  $\mu\text{mol/l}$   $\text{FeCl}_3$ , deren Eisenkonzentration nach Reduktion der Eisen(III)-Ionen durch Ascorbinsäure mit Bathophenanthrolindisulfonat (5) gemessen worden war, wurden nach der angegebenen Modifikation mit HCl-Ethanol und Ammoniumthiocyanatlösung (2,63 mol/l) versetzt. Es ergaben sich rötlich gefärbte Ansätze, die sofort nach Mischen eine konstante Absorption zeigten; während des überprüften Zeitraums bis zu 40 Minuten änderte sich die Lichtabsorption nicht. Das entstandene Eisen(III)-thiocyanat absorbierte maximal zwischen 490 und 492 nm. In dem geprüften Bereich von 25 bis 1000  $\mu\text{mol/l}$   $\text{FeCl}_3$  bestand ein geradliniger Zusammenhang zwischen der Konzentration an Eisen(III)-Ionen und der bei 480 bzw. 492 nm gemessenen Absorption.

Weiterhin untersuchten wir, ob die Farbentwicklung von der Konzentration an Thiocyanat-Ionen abhängig ist. Bei Einsatz von  $\text{NH}_4\text{SCN}$  in Endkonzentrationen von 37 mmol/l (Originalvorschrift von Proelss & Wright (1)) bis zu 357 mmol/l nahm die Farbintensität kontinuierlich zu, ohne ein Plateau zu erreichen (Abb. 1). Höhere Endkonzentrationen konnten aus Löslichkeitsgründen nicht eingesetzt werden. Wegen der größeren Empfindlichkeit der Indikatorreaktion wurde die Farbentwicklung von uns – abweichend von der Originalvorschrift – mit 200  $\mu\text{l}$  einer Lösung von 6,6 mol/l Ammoniumthiocyanat durchgeführt, so daß die Endkonzentration in den Testen 357 mmol/l betrug.

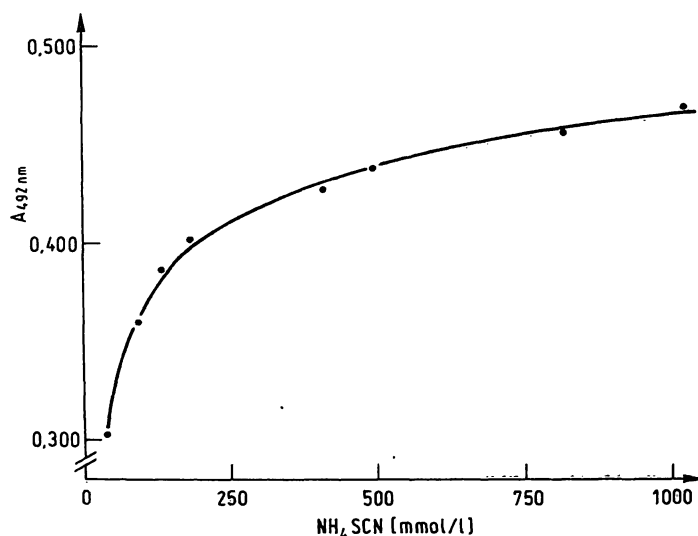


Abb. 1. Abhängigkeit der Farbentwicklung von der Konzentration an Ammoniumthiocyanat im Test.  
Endkonzentration an Eisen(III)-Ionen 28,2  $\mu\text{mol/l}$ .

Die Bildung des Eisen(III)-thiocyanats ist zwischen + 4 und + 40 °C nur geringfügig von der Temperatur abhängig, zwischen + 20 bis + 25 °C ergaben sich keine Unterschiede in den Absorptionen.

### Spontane Oxidation von Eisen(II)- zu Eisen(III)-Ionen

Nach den Angaben von Proelss & Wright (1) oxidiert das aus Linolsäure durch die Wirkung von Lipoxxygenase entstandene Fettsäure-Hydroperoxid eine stöchiometrische Menge Eisen(II)- zu Eisen(III)-Ionen. Wir untersuchten zunächst die Reaktion von Ammonium-eisen(II)-sulfat mit Ammoniumthiocyanat in Anwesenheit von Salzsäure-Alkohol und fanden bei der im Test verwendeten Konzentration an Ammoniumeisen(II)-sulfat eine ständige, geradlinige Absorptionszunahme von etwa 0,010/min bei 480 nm. Bei höheren Konzentrationen ergaben sich noch höhere unspezifische Absorptionsanstiege. Diese spontane Oxidation von Eisen(II)- zu Eisen(III)-Ionen ließ sich durch Zugabe von Ascorbinsäure verhindern; es gelang jedoch nicht, eine Ascorbinsäurekonzentration zu finden, die die Farbreaktion bei Einsatz definierter Mengen von Eisen(III)-chlorid unbeeinflusst läßt. Konzentrationen des Reduktionsmittels, die in Abwesenheit von Eisen(III)-Ionen zu einem konstanten Meßsignal führen, bewirken andererseits nach Zugabe von  $\text{FeCl}_3$  bereits eine Reduktion der Eisen(III)-Ionen und damit eine Verminderung der Farbintensität. Ascorbinsäure kann daher dem Test nicht zugesetzt werden.

### Bestimmung von Linolsäure mit der Farbreaktion

Folgt man der Originalvorschrift von Proelss & Wright (1), so wurde bei Einsatz verschiedener Linolsäure-Standardlösungen keine Abhängigkeit des Meßsignals von der Linolsäurekonzentration gefunden. Die Ursache

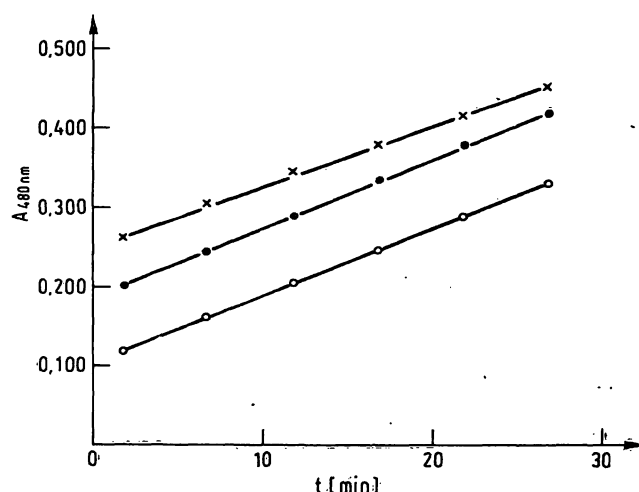


Abb. 2. Abhängigkeit der Farbentwicklung von der Inkubationszeit bei Einsatz von Linolsäure-Standardlösungen. Bestimmung nach Umsetzung mit Lipoxxygenase, Ammoniumeisen(II)-sulfat und Ammoniumthiocyanat.  
○—○ Leerwert  
●—● 10  $\mu\text{mol/l}$  Linolsäure-Standardlösung im Test  
x—x 20  $\mu\text{mol/l}$  Linolsäure-Standardlösung im Test  
(Die absolute Höhe der Absorptionen kann der Abbildung nicht entnommen werden, da ein Küvettenfehler nicht ausgeschlossen wurde.)

liegt in der ausgeprägten Änderung der Farbintensität der Ansätze mit der Zeit, wie sie in Abbildung 2 für einen Reagentien-Leerwert und Standardlösungen mit 10 bzw. 20  $\mu\text{mol/l}$  Linolsäure dargestellt sind. Die Änderung der Farbintensität mit der Zeit ist abhängig von der Linolsäurekonzentration im Test. Je höher die Fettsäurekonzentration, desto geringer ist die relative Absorptionzunahme in Abhängigkeit von der Dauer der Inkubation. Auf die Darstellung des Verlaufs bei Einsatz noch höherer Linolsäurekonzentrationen wurde aus Gründen des Maßstabs verzichtet. Die Ergebnisse zeigen, daß die photometrische Messung aller Ansätze stets im gleichen zeitlichen Abstand nach der Zugabe der Ammoniumthiocyanatlösung vorgenommen werden muß. Wir folgten daher den Angaben von Koch et al. (6) zur Farbreaktion, bei denen genau 30 Sekunden nach Zugabe des Ammoniumeisen(II)-sulfats die Ammoniumthiocyanatlösung zugefügt wird und die photometrische Messung exakt 3 Minuten später erfolgt. Unter diesen Bedingungen ergab sich eine Proportionalität zwischen eingesetzter Linolsäuremenge und Absorption in einem weiten Konzentrationsbereich von 10 bis 200  $\mu\text{mol/l}$  Linolsäure im Test. Ansätze mit 0,5 ml einer 50  $\mu\text{mol/l}$  Linolsäure-Standardlösung zeigten bei 492 nm und 1 cm Schichtdicke eine Absorption von 0,360.

#### Umsatz von Trilinolein durch Lipoxxygenase

Im Gegensatz zu der Annahme von Proelss & Wright (1), daß Trilinolein kein Substrat für die verwendete Lipoxxygenase darstellt, fanden wir einen meßbaren Umsatz des Triglycerids durch das Enzym in Abhängigkeit von der Zeit und der Enzymaktivität. Inkubiert man die Trilinolein-Emulsion (Lösung 6) 10–60 Minuten lang bei + 25 °C einmal ohne und einmal mit Zusatz des Hilfsenzym und führt anschließend die Farbreaktion aus, so ergibt sich bei der von Proelss & Wright (1) angegebenen Lipoxxygenase-Aktivität ein Substratumsatz von 1,8–2,4 nmol/Testansatz in 10 Minuten entsprechend 1,1–1,4% des eingesetzten Trilinoleins. Dieser unspezifische Umsatz des Lipasesubstrats durch das Hilfsenzym ist relativ gering und wird durch den Ansatz eines Substrat-Leerwerts kompensiert.

#### Einsatz von Seren

Bestimmt man die Lipaseaktivität verschiedener Seren mit dem Verfahren von Proelss & Wright (1) unter Einhaltung der von Koch et al. (6) ausgearbeiteten Bedingungen für die Farbreaktion, so findet man an Normalseren und Proben mit stark erhöhter Lipaseaktivität Ergebnisse, deren Relationen den im titrimetrischen Test ermittelten Werten größenordnungsmäßig entsprechen. Aufgrund der Berechnung mit Differenzbildung aus fünf relativ hohen Absorptionen ist die Präzision der Methode jedoch außerordentlich gering. Dies geht aus den in Tabelle 3 als Beispiel zusammengestellten Daten hervor. Die angenommenen Streu-

Tab. 3. Bestimmung der Lipaseaktivität nach Proelss & Wright (1) mit modifizierter Farbreaktion und Ablesung nach Koch et al. (6).

Berechnungsbeispiel für ein Serum mit einer im Normbereich liegenden Lipaseaktivität unter der Annahme, daß die Meßwerte bei Dreifachbestimmungen jeweils um  $\pm 0,010$  schwanken.

	Absorption bei Hg 492 nm, 1 cm Schichtdicke, Ablesung gegen bidest. Wasser		
	1.	2.	3.
Probe	0,450	0,440	0,460
Proben-Leerwert	0,250	0,260	0,240
Substrat-Leerwert	0,300	0,310	0,290
Reagentien-Leerwert	0,150	0,140	0,160
Linolsäure-Standard	0,500	0,510	0,490
Katalytische Aktivität	35, 7 U/l	6, 8 U/l	60, 8 U/l

ungen der Meßwerte sind durchaus realistisch; unter unseren Drei- bis Vierfachwerten fanden sich trotz sorgfältiger Arbeitsweise und Beachtung der von Koch et al. (6) beschriebenen Zeitintervalle häufig Absorptionsunterschiede von  $\pm 5\%$ . In dem Beispiel wurde aus Gründen größerer Übersichtlichkeit angenommen, daß die Meßsignale um  $\pm 0,010$  unsicher sind, eine Größenordnung, die in der Klinischen Chemie bei Routineverfahren – wie der Bestimmung der Konzentrationen von Glucose, Harnstoff, Harnsäure u.a. Metaboliten – ohne weiteres toleriert wird. Wie Tabelle 3 zeigt, ergaben sich schon bei relativ geringen Absorptionsdifferenzen Schwankungen im Ergebnis zwischen 6, 8 und 60,8 U/l. Dies entspricht einem Variationskoeffizienten von etwa 38%.

Wir fanden an Normalseren in verschiedenen Serien u.a. Ergebnisse zwischen – 10 („negative Aktivität“) und 15 U/l, d.h., katalytische Aktivitäten im Normbereich sind praktisch nicht von Null zu unterscheiden.

Auch bei erheblichem experimentellen Aufwand – Zusammenarbeit von zwei Untersuchern, Vierfachbestimmungen, Pipettieren und Ablesen nach Stoppuhr – gelingt es nicht, die Streuung so gering zu halten, daß ein Normbereich abzugrenzen oder die Berechnung einer Korrelation zu den Ergebnissen des titrimetrischen Tests mit Triolein als Substrat gerechtfertigt gewesen wäre.

Wegen der mangelnden Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden von uns keine Verdünnungsreihen hochaktiver Seren analysiert, so daß über eine lineare Beziehung zwischen Meßsignal und eingesetzter Enzymmenge keine Aussage gemacht werden kann.

#### Einfluß der Gallensäurekonzentration

Zur Prüfung der Abhängigkeit des Substratumsatzes von der Gallensäurekonzentration wurden Seren mit hoher

Lipaseaktivität (700–2.100 U/l im titrimetrischen Test) ohne und in Anwesenheit von 0,72, 1,8, 3,6 und 5,4 mmol/l Natriumdesoxycholat untersucht. Um die Fehler möglichst klein zu halten, wurden Haupt- und Leerwerte mit den genannten Gallensäurekonzentrationen im Substrat jeweils in einer Serie analysiert. Die Absorptionsdifferenzen der einzelnen Proben zeigten nur in 20% bei der von *Proelss & Wright* (1) empfohlenen Konzentration von 3,6 mmol/l Natriumdesoxycholat ein Maximum. Die höchste Absorptionsdifferenz fand sich meist bei geringeren, selten bei höheren Gallensalzkonzentrationen, so daß sich ein für alle Seren zutreffendes Optimum nicht festlegen läßt. Auch bei Einsatz von Natriumglykocholat in die Substratemulsion gelang es nicht, eine Konzentration zu ermitteln, bei der die verschiedenen Proben einen maximalen Substratumsatz aufwiesen.

### Messung im UV-Bereich

Lipoxygenase bewirkt nicht nur die Oxidation von Linolsäure u. a. Substraten, sondern auch die Bildung konjugierter Doppelbindungen aus Strukturen, in denen die Doppelbindungen durch Methylengruppen getrennt sind. Mit Linoleat als Substrat wird 13-Hydroperoxy-octadeca-9,11-dienoat gebildet, das im kurzwelligen UV-Bereich um 234 nm eine starke Absorption zeigt. Diese Eigenschaft wurde zuerst von *Theorell et al.* (2) zur Bestimmung der katalytischen Aktivität von Lipoxygenase-Präparationen benutzt. Wir versuchten, die an die Hydrolyse des Trilinoleins durch Lipase angeschlossene Hilfsreaktion mit Lipoxygenase direkt in einem kontinuierlichen Test als Indikatorreaktion zu verwenden, um so alle Probleme der Farbreaktion zu eliminieren.

Stark verdünntes Serum absorbiert im kurzwelligen UV-Bereich bereits erheblich. Da diese Absorption bei der von *Bergmeyer et al.* (7) zur Bestimmung der Lipoxygenaseaktivität empfohlenen Wellenlänge von 238 nm nur etwa halb so hoch ist wie bei 234 nm, führten wir die weiteren Messungen bei 238 nm aus.

Bei der kontinuierlichen Registrierung des Reaktionsablaufs der Ansätze mit Probe ist eine lag-Phase zu erkennen, deren Dauer von der Lipaseaktivität der Probe und der Gallensäurekonzentration im Test abhängig ist. In Anwesenheit optimaler Konzentrationen von Glyko- oder Desoxycholat beträgt sie bei Normalserum 30–45 Minuten, bei Pankreatitissersum zwischen 5 und 10 Minuten. Auch bei katalytischen Aktivitäten um 2000 U/l (im titrimetrischen Test gemessen) ergibt sich erst nach etwa 5 Minuten eine konstante Absorptionsänderung pro Zeiteinheit. Nach Durchlaufen eines Wendepunktes flacht die Absorptionsänderung pro Minute wieder ab.

Wir variierten die Gallensäurekonzentration im Substrat und stellten fest, daß die von uns untersuchten Proben ihr Optimum im Gegensatz zu den Angaben von *Proelss*

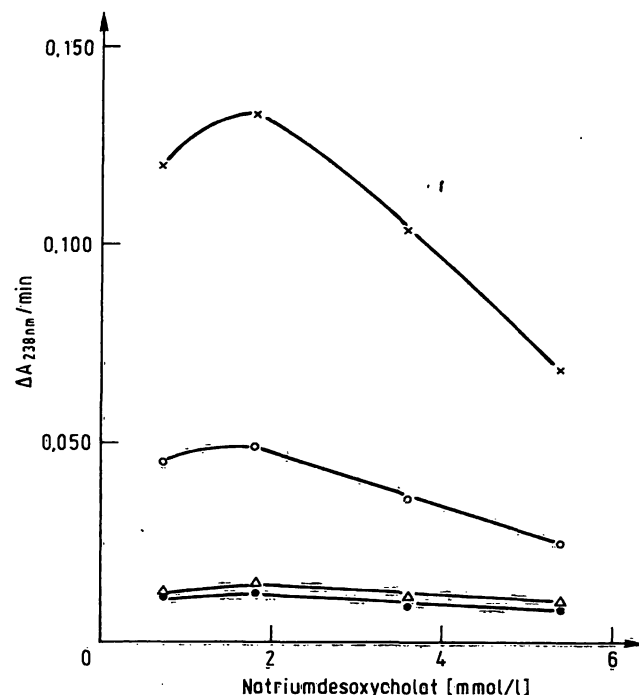


Abb. 3. Bestimmung der Lipase im UV-Test bei 238 nm. Abhängigkeit des Meßsignals von der Endkonzentration an Natriumdesoxycholat im Test.

- Normalserum
- Pankreatitissersum I
- x—x Pankreatitissersum II
- △—△ Postheparinserum

& Wright (1) nicht bei 3,6 mmol/l Natriumdesoxycholat, sondern bei 1,8 mmol/l zeigten (s. Abb. 3). Unter Verwendung von Natriumglykocholat ergaben sich die höchsten Substratumsätze bei 0,75 mmol/l des Gallensalzes, wobei die gemessenen Absorptionsdifferenzen unabhängig von der katalytischen Aktivität der eingesetzten Probe – Normalserum, Pankreatitissersum oder Postheparinserum – um durchschnittlich etwa 20% unter denjenigen in Anwesenheit einer optimalen Menge Natriumdesoxycholat lagen.

Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen eingesetztem Probevolumen und Meßsignal ergaben an einem Pankreatitissersum nur bei Verdünnung mit inaktiviertem Sammelserum bis zum Einsatz von 10 µl Probe in den Test und bei Erhöhung der katalytischen Aktivität des Hilfsenzym Lipoxygenase auf das Fünffache der in der Originalvorschrift (1) angegebenen Menge eine geradlinige Beziehung zwischen den beiden Größen (s. Abb. 4).

Auch die Relationen der an verschiedenen Proben gemessenen Ergebnisse entsprachen bei Einsatz von 10 µl Probe größenordnungsmäßig den im titrimetrischen Test ermittelten katalytischen Aktivitäten.

Dennoch ist das beschriebene Vorgehen zur routinemäßigen Bestimmung der Lipaseaktivität nicht geeignet. Bei Verwendung niedriger Lipoxygenasekonzentrationen und geringer Probevolumina ist die Auswertung bei zahlreichen Patientenserum dadurch unkorrekt, daß die

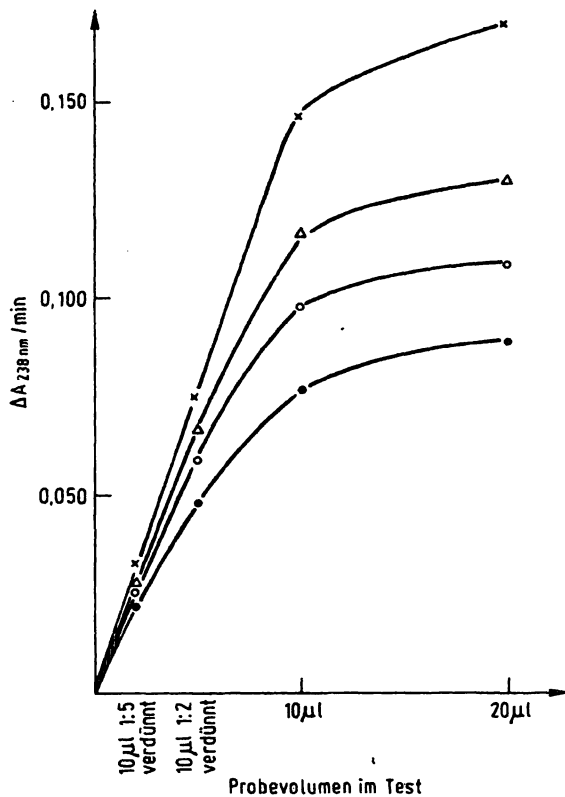


Abb. 4. Bestimmung der Lipase im UV-Test bei 238 nm.  
Abhängigkeit des Meßsignals von der Serummenge und der Lipoxxygenaseaktivität im Test.  
x—x 0,83 kU/l Lipoxxygenase im Test  
Δ—Δ 0,165 kU/l Lipoxxygenase im Test  
○—○ 0,083 kU/l Lipoxxygenase im Test  
●—● 0,041 kU/l Lipoxxygenase im Test  
Serumverdünnungen mit inaktiviertem Sammelserum.

linearen Absorptionsänderungen pro Zeiteinheit bei Proben-Leerwerten und Bestimmungsansätzen zu unterschiedlichen Zeiten auftreten. Zum anderen ergibt sich bei Einsatz größerer Konzentrationen Lipoxxygenase in den Substrat-Leerwerten ein nichtlinearer Umsatz von Trilinolein, so daß eine Korrektur nicht möglich ist. Auch die mangelnde Empfindlichkeit des UV-Tests und die ungünstigen optischen Bedingungen schränken die Anwendbarkeit des Verfahrens außerordentlich ein.

## Diskussion

### Farbreaktion

Obwohl Trilinolein sich im kontinuierlichen titrimetrischen Test als spezifisches Substrat für Lipase erwies, kamen wir mit dem Verfahren von Proelss & Wright (1) nicht zu reproduzierbaren Ergebnissen. Wir prüften daher einzelne Reaktionsschritte dieses zusammengesetzten Tests.

Die Lichtabsorption des gebildeten Eisen(III)-thiocyanats ist nicht nur von der Konzentration an Eisen-(III)-Ionen, sondern auch von derjenigen der Thiocyanat-

Ionen abhängig. Als Ursache ist vor allem die Bildung von intensiver gefärbten  $[\text{Fe}(\text{SCN})_6]^{+++}$ -Ionen zu diskutieren (8). Weiterhin wird die Farbreaktion durch Autoxidation von Eisen(II)- zu Eisen(III)-Ionen gestört. Die Zugabe der Reagentien muß daher in genauem zeitlichen Abstand entsprechend der Vorschrift von Koch et al. (6) vorgenommen werden. Angaben hierzu fehlen bei Proelss & Wright (1) völlig.

Trotz Einhaltung des von Koch et al. (6) beschriebenen Verfahrens gelang es nicht, die Lipaseaktivität von Normalserum zuverlässig zu ermitteln. Dies liegt vor allem an der komplizierten Berechnungsweise der Ergebnisse aus fünf Absorptionsmessungen (s. Tab. 3). Die Vielzahl der Ansätze ist notwendig, da – im Gegensatz zu den üblichen Zweipunkttesten – kein Leerwert angesetzt werden kann, dem das zu untersuchende Serum erst nach Abstoppen der Reaktion zugesetzt wird. Stattdessen sind getrennt Proben-, Substrat- und Reagentien-Leerwerte zu ermitteln.

Es ist notwendig, einen Substrat-Leerwert anzusetzen, da auch das Lipasesubstrat Trilinolein durch das Hilfsenzym Lipoxxygenase umgesetzt wird. Zum gleichen Ergebnis kamen Griebel et al. (9) mit einer anderen Methodik. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Angaben von Proelss & Wright (1).

Die in der Originalvorschrift empfohlene Konzentration von 3,6 mmol/l Natriumdesoxycholat im Test stellt nicht bei allen untersuchten Seren das Optimum dar.

### UV-Test

Zur Prüfung der ersten beiden Teilschritte der Methode bestimmten wir das Produkt der Lipoxxygenase-Reaktion durch kontinuierliche Messung im UV-Bereich. Im Gegensatz zu den Angaben von Proelss & Wright (1) handelt es sich hierbei nicht um Linoleathydroperoxid, sondern um 13-Hydroperoxyoctadeca-9,11-dienoat (10). Es zeigte sich, daß aufgrund des ungünstigen Quotienten der Geschwindigkeiten von Lipase- und Indikatorreaktion eine lag-Phase auftritt, deren Dauer zwischen 30 und 45 Minuten bei Normalseren bzw. zwischen 5 und 10 Minuten bei Proben mit stark erhöhter katalytischer Aktivität schwankt. Die nach der Originalvorschrift im Test enthaltene Lipoxxygenaseaktivität entspricht 0,165 U/ml, die  $K_m$  für Linoleat 1 mmol/l (11). Verwendet man Serum mit einer Lipaseaktivität von 100 U/l, so befinden sich bei Einsatz von 10  $\mu\text{l}$  Probe 0,001 U in einem Testvolumen von 1,02 ml, d.h. 0,00098 U im Milliliter Testansatz. Unter Berücksichtigung der von Proelss & Wright (1) mit 10  $\mu\text{mol/l}$  angegebenen  $K_m$  für die Spaltung von Trilinolein durch Lipase ergibt sich folgendes Verhältnis:

$$\left( \frac{V}{K_m} \right)_{\text{Lipoxxygenase}} : \left( \frac{V}{K_m} \right)_{\text{Lipase}} = \frac{0,165}{1 \cdot 10^{-3}} : \frac{0,00098}{1 \cdot 10^{-5}}$$

Dies entspricht 165:98, d.h., die Lipoxygenase ist nur in 1,6-fachem Überschuß vorhanden. Bei einer Lipaseaktivität von 1000 U/l kehrt sich das Verhältnis sogar in etwa 1:6 zu ungunsten des Hilfszyms um. Zum Vergleich sei angeführt, daß das oben genannte Verhältnis der Quotienten  $V/K_m$  bei der Bestimmung der Aktivität der Alaninaminotransferase eines Serums mit 100 U/l 95:1 beträgt (Bergmeyer (12)). Somit findet die von uns beobachtete lag-Phase ihre Erklärung in der ungenügenden katalytischen Aktivität des Hilfszyms. Andererseits kann nicht wesentlich mehr Lipoxygenase in den Test eingesetzt werden, weil dann die nichtlineare Oxydation des Trilinoleins die Auswertung unmöglich macht.

Da Proelss & Wright (1) mitteilen, die Aktivität von Normalseren sei bei 234 nm nicht zu messen, ist zu ver-

muten, daß sie die außerordentlich lange lag-Phase nicht abgewartet haben.

Auch mit dem UV-Test konnte gezeigt werden, daß die optimale Konzentration von Natriumdesoxycholat nicht bei 3,6 mmol/l liegt, sondern um 1,8 mmol/l. Mit Glykocholat wurde die höchste katalytische Aktivität bei einer Endkonzentration von 0,75 mmol/l gefunden; dies stimmt mit den im kontinuierlichen titrimetrischen Test ermittelten Daten gut überein (13).

Abschließend ist darauf hinzuweisen, daß Reaktionen mit lag-Phase in einem Zweipunktttest nicht gemessen werden können. Somit kann die von Proelss & Wright (1) beschriebene Methode – unabhängig von den bei der Farbreaktion auftretenden Problemen – nicht zu zuverlässigen Ergebnissen führen.

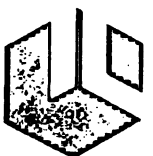
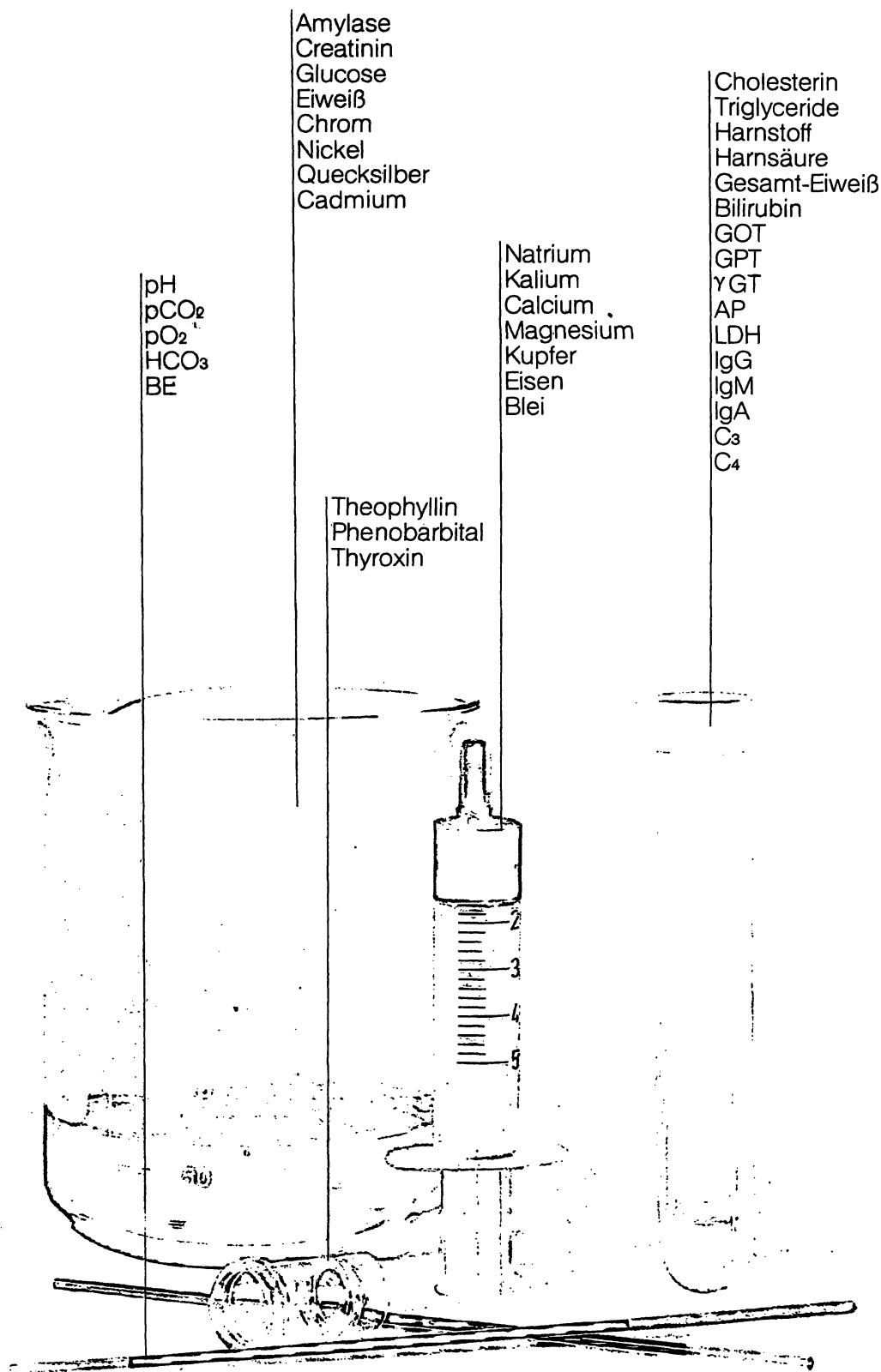
## Literatur

1. Proelss, H. F. & Wright, B. W. (1977) Clin. Chem. 23, 522–531.
2. Theorell, H., Bergström, S. & Akeson, A. (1946) Pharm. Acta Helv. 21, 318–324.
3. Rick, W. (1969) Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 7, 530–539.
4. Rick, W. & Hockeborn, M., in Vorbereitung.
5. Schade, A. L., Oyama, J., Reinhart, R. W. & Miller, J. R. (1954) Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 87, 443–448.
6. Koch, R. B., Stern, B. & Ferrari, C. G. (1958) Arch. Biochem. Biophysics 78, 165–179.
7. Bergmeyer, H. U., Gawehn, K. & Grassel, M. (1974) Enzyme als biochemische Reagentien. Lipoxygenase. In: Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U. ed.). 3. Aufl. Verlag Chemie, Weinheim pp. 515–516.
8. Meyer, R. J. (1932) Eisen. Teil B. Die Verbindungen des Eisens. In: Gmelins Handbuch der anorganischen Chemie (Deutsche Chemische Gesellschaft ed.). 8. Aufl. Verlag Chemie, Berlin p. 747.
9. Griebel, R. J., Knoblock, E. C. & Koch, T. R. (1981) Clin. Chem. 27, 163–165.
10. Hamberg, M. & Samuelsson, B. (1965) Biochem. Biophys. Res. Comm. 21, 531–536.
11. Tappel, A. L. (1962) Lipoxidase. In: Methods in Enzymology (Colowick, S. P. & Kaplan, N. O. eds.) Academic Press, New York, Vol. V, pp. 539–542.
12. Bergmeyer, H. U. (1974) Bestimmung der Aktivität von Enzymen. In: Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., ed.). 3. Aufl. Verlag Chemie, Weinheim pp. 129–140.
13. Rick, W. & Hockeborn, M. in Vorbereitung.

Prof. Dr. W. Rick  
Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik  
der Universität Düsseldorf  
Moorenstraße 5  
D-4000 Düsseldorf 1



# Was müssen Sie sonst noch analysieren?



**Instrumentation  
Laboratory**

## Das große Programm für individuelle Lösungen.

Ob Normalroutine oder Notfallanalyse, ob Standard- oder Spezialuntersuchungen – IL bietet Ihnen Lösungen für Ihre Analysenprobleme.

### Vier in Eins.

Der IL Multistat III-F/LS vereinigt erstmals vier optische Meßprinzipien in einem System:

1. Absorptionsphotometrie
2. Turbidimetrie
3. Fluorometrie
4. Nephelometrie

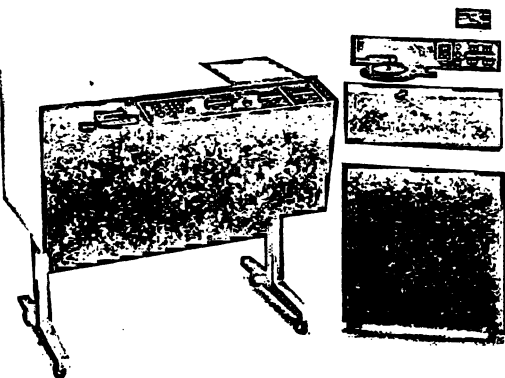
Durch die verschiedenen Meßmethoden ergibt sich eine Vielzahl von Einsatzmöglichkeiten in der klinischen Chemie, der Gerinnungsanalytik, der Toxikologie und Pharmakologie und in der Lebensmittelanalytik. Der geringe Probenverbrauch (2–25 µl) macht das Gerät besonders auch für Pädiatrie, Geriatrie und die Tiermedizin interessant.

Nicht nur die Normalroutine, sondern auch Spezialuntersuchungen werden vollmechanisiert, computergesteuert durchgeführt.

Die Fluoreszenz-Einrichtung erlaubt den Einsatz von homogenen Fluoreszenz-Immuno-Assay (FIA) Techniken, z. B. zur Bestimmung des Serum-Medikamentenspiegels. Neue spezifische Analysenmöglichkeiten, z. B. die Bestimmung der Gesamt-Gallensäuren, die kinetische Bestimmung der Säuren Phosphatase oder anderer spezieller Enzyme werden ermöglicht.

Die kinetische Turbidimetrie und Nephelometrie läßt einen hohen Analysendurchsatz von bestimmten Plasmaproteinen zu.

Der IL Multistat III-F/LS führt ca. 250 Tests pro Stunde bei geringen Kosten (Reagenzienverbrauch pro Test 100–200 µl) durch. Leichte Bedienung und Dokumentation der Ergebnisse durch den eingebauten Drucker sind selbstverständlich. Die Analysenprogramme sind auf Kassetten gespeichert und jederzeit erweiterbar.



IL Multistat III-F/LS

Die folgenden Kurzbeschreibungen geben Ihnen einen ersten Eindruck der Leistungsmöglichkeiten unserer Analysengeräte. Selbstverständlich lassen sie sich untereinander kombinieren oder vielfältig erweitern. Zubehör und benötigte Reagenzien finden Sie ebenfalls in unserem Programm für das Labor.

### Schnell und selektiv.

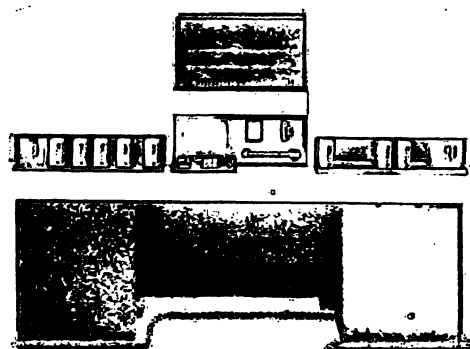
Das IL504/508 Elektrolyt/Substrat-Analysensystem führt bis zu 800 Bestimmungen pro Stunde durch. Wahlweise können Natrium, Kalium, Chlorid, Gesamt CO<sub>2</sub> oder Glucose, Harnstoff, Creatinin, Gesamteiweiß oder Calcium oder alle 8 Parameter bestimmt werden. Variable Ausbaumöglichkeiten lassen Ihnen die Wahl zwischen 4, 6, 7 oder 8 Parametern.

Das Parameter-Programm ist voll selektierbar und dadurch besonders wirtschaftlich, denn ein Reagenzienverbrauch für nicht angeordnete Bestimmungen wird so vermieden. Durch Mikroproben- und Mikroreagenzien-Volumina werden die Kosten pro Test zusätzlich extrem niedrig gehalten.

Die Bestimmung der angewählten Parameter erfolgt über modernste methodische Technologien. Die Natrium- und Kalium-Bestimmung wird mit ionenselektiven Elektroden durchgeführt, die keinen Membranwechsel mehr erfordern und leicht austauschbar sind.

Durch den geringen Wartungsaufwand und die kontinuierliche automatische Probenzuführung ist das Gerät praktisch permanent einsetzbar. Serum-, Plasma- oder Urinproben können sowohl in der Routine- als auch in der Notfallanalyse durchgeführt werden.

Wie alle IL-Geräte zeichnet sich auch das Elektrolyt/Substrat-Analysensystem durch einfachste Bedienung aus. Der eingebaute Bildschirm zeigt Testergebnisse sowie systemdiagnostische Informationen und gibt zusätzlich Bedienungshinweise und Fehleranzeigen.



IL 508

Alle IL-Geräte sind für den Anschluß an zentrale Datenverarbeitungssysteme vorbereitet. Hoher Probendurchsatz und größte Meßgenauigkeit sind ebenso wie die leichte Handhabung Vorteile, die für IL-Geräte sprechen.

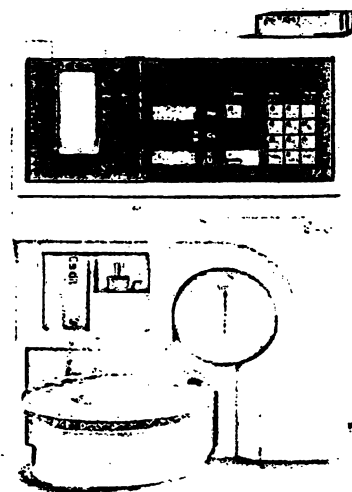
### Neue Maßstäbe in der Flammenphotometrie.

Durch das Flammenphotometer I erhält die Referenzmethode Flammenphotometrie neue beeindruckend Argumente.

Das IL943 bestimmt Natrium, Kalium und Lithium aus nur 20 µl Probe automatischer Verdünnung über eingebauten Kolbendilutor. Die Messung eines internen Cäsium-Standards sorgt für optimale, präzise Lithium-Bestimmungen, wobei Spül- und Reinigungs Vorgänge gänzlich entfallen.

Die Verwendung des Kolbendilutors verhindert Verstopfungen. Dieser wesentliche Vorteil sowie die leichte Bedienbarkeit lassen das IL943 zu einem notwendigen Bestandteil Ihrer Routineanalysen werden. Die Probenanalyse von Serum, Urin oder sonstige biologische Flüssigkeiten – wird leicht über eine Eingabetastatur programmiert. Bis zu 100 Proben pro Stunde und die Möglichkeit, Notfallanalysen zwischen Routineanalysen schnell durchzuführen, sind überzeugender Beweis für die Leistungsfähigkeit des Systems.

Automatische Zweipunktkalibrierung für Natrium, Kalium und Lithium ist selbstverständlich, ebenso wie die vielfältigen Ausbaumöglichkeiten. So kann das IL943 mit oder ohne integrierten Drucker geliefert werden. Das automatische Probenzuführungssystem gehört ebenfalls zu den Standardbaustufen.



IL943

ern Sie mit umseitiger Antwort-  
ausführliche Informationen oder  
Gerätevorführung an!

## automatische gasanalyse.

en Blutgasmodellen IL1302 und  
3 stehen zwei vollautomatische  
me zur Verfügung, die durch ihre  
ingsweisende Konzeption in je-  
modernen Labor ihren Platz fin-

te Präzision, selbst bei kleinsten  
envolumina, und hohe Zuverläss-  
it sind bestimmend für ihre Lei-  
t.

ohl im Routine- wie auch im Not-  
trieb zeichnen sich beide Geräte  
n leichte Handhabung aus. Ein  
plettes Blutgas-Qualitätskontroll-  
amm von IL, bestehend aus Kon-  
materialien und Auswertung, gibt  
n die erforderliche Sicherheit.

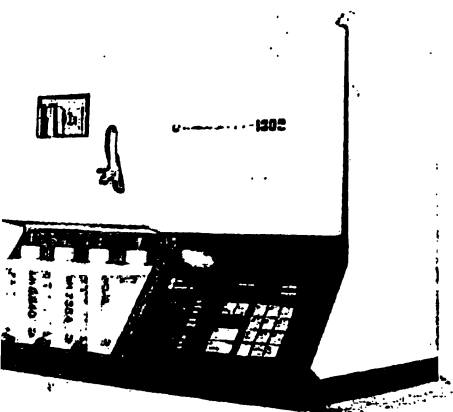
on IL entwickelten neuartigen  
roden reduzieren die Wartungsar-  
n und -kosten auf ein Minimum.

eingebaute Thermodrucker doku-  
tiert Datum, Uhrzeit, Kalibrierdaten  
Meß- und Rechenwerte.

tzlich verfügt das IL1303 über ei-  
Bildschirm zur Anzeige weiterer  
nteninformationen und Anleitung  
ie Durchführung von Wartungs-  
Service-Checks.

h die Adaption eines IL282 CO-  
meters an den Blutgasanalysator  
lten Sie zusätzlich gemessene  
oglobin-, Sauerstoffsättigungswert  
nd weitere Hb-Derivate. Alle Daten  
len über den Drucker des Blut-  
analysators ausgedruckt.

den Blutgasmodellen von IL legen  
den Grundstein für ein ausbaufähig-  
leistungsstarkes Blutgasanalyse-  
rum.



**IL1302**

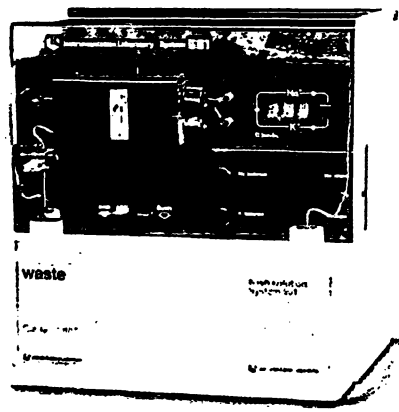
## Elektrolytbestimmung ohne Flamme.

Mit den neuen ionenselektiven Elektro-  
lytsystemen IL501 und IL502 können  
Sie jetzt ohne Flamme, Propan- oder  
Acetylgas und Druckluftversorgung  
eine exakte Bestimmung der Elektroly-  
te Natrium und Kalium vornehmen.

Die kompakte Ausführung und die Be-  
dienungsfreundlichkeit machen diese  
Modelle zur idealen Ergänzung Ihres  
Labors – als Routine- oder als Notfall-  
system.

Die neuartige Elektrodenkonzeption  
reduziert die erforderlichen Wartungs-  
arbeiten und -kosten auf ein Minimum.  
Sie können zwischen Vollautomat  
(IL502) oder Halbautomat (IL501) wäh-  
len – und sich so preisgünstig für das  
Gerät entscheiden, das Ihrem Bedarf  
bestmöglich angepaßt ist.

Durch den ständig betriebsbereiten  
Zustand beider Systeme wird eine so-  
fortige Diagnostizierung Ihrer Patienten  
möglich. Als Probenmaterial kann Voll-  
blut, Plasma, Serum oder Urin ver-  
wandt werden.



**IL501**

## Atom-Spektroskopie in der klinischen Chemie.

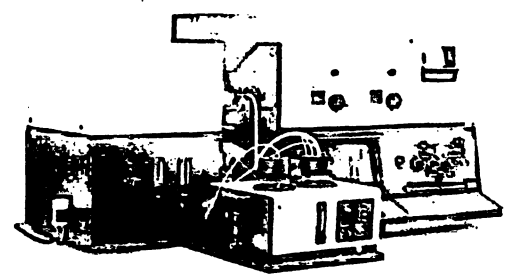
Die Methode der Atom-Spektroskopie  
wird immer häufiger in klinisch-chemi-  
schen Laboratorien routinemäßig einge-  
setzt.

Die Anwendungsbreite der Atom-  
Spektroskopie ist dank Ihrer Spezifität  
und geringen Störanfälligkeit so groß,  
daß sie für alle klinisch-chemischen  
Problemstellungen eingesetzt wird,  
wenn es um die Analyse von Metallen  
geht.

Das klassische Analysenprogramm  
der klinischen Chemie erfährt auch  
hinsichtlich des Probenmaterials eine  
Ausweitung. Es werden außer den  
Körperflüssigkeiten Blut, Urin, Magen-  
saft, Liquor cerebrospinalis auch  
Gewebe als Untersuchungsmaterialien  
eingesetzt, da diese heute durch  
Punktion einfach zu erhalten sind.

Für die Analyse von Metallen in der  
klinischen Chemie bietet IL ein voll-  
ständiges Programm für alle Anwen-  
dungsprobleme. IL Atom-Spektropho-  
tometer sind so konzipiert, daß maxi-  
male Leistung und besonders gute  
Nachweis-Empfindlichkeiten erreicht  
werden. Alle Modelle enthalten die  
gleiche, besonders lichtdurchgängige  
Optik, ein Brennersystem mit aus-  
gefeilten Sicherheitseinrichtungen und  
integrierte Computer-Steuerung.

Auch für die flammenlose Atom-Ab-  
sorption, die z. B. für die quantitative  
Bestimmung essentieller Spurenele-  
mente und toxikologisch interessanter  
Schwermetalle, wie Pb, Cd, Hg oder Tl,  
eingesetzt wird, hat IL das richtige Zu-  
behör.



**IL AAS**

# **Das umfassende Programm** **für Ihr Labor.**

**IL Multistat III-F/LS** für Enzym- und Substratbestimmungen sowie spezielle Untersuchungen.

**IL504/508** für die häufigsten Routineanalysen.

**IL943** für die moderne Flammenphotometrie.

**IL1302/1303** für die vollautomatische Blutgasanalyse.

**IL501/502** für die problemlose Natrium/Kalium-Bestimmung

**IL AAS** für die präzise Metallanalyse.

**Fordern Sie ausführliche Informationen mit untenstehender Antwortkarte an!**

**Ich interessiere mich für**

- ☐ Analysenautomat IL Multistat III-F/LS
- ☐ Elektrolyt/Substrat-Analysensystem IL 504/508
- ☐ Flammenphotometer IL 943
- ☐ Blutgasmodelle IL 1302/1303
- ☐ Ionenselektive Elektrolytsysteme IL 501/502
- ☐ IL Atom-Absorptions-Spektroskopie

**Ich bitte um**

- ☐ ausführliches Informationsmaterial
- ☐ Besuch Ihres Fachberaters
- ☐ Gerätevorführung

Datum

Unterschrift



**Instrumenta  
Laborator**

Instrumentation Laboratory GmbH  
Kleinstraße 14  
D-5303 Bornheim 2  
Deutschland  
Telefon 0 22 22 / 83 10  
Telex 8 869 361

Instrumentation Laboratory Ges.m.b.H.  
Linke Wienzeile 130 a  
A-1060 Wien  
Österreich  
Telefon 0222 / 57.83.88 – 57.83.89  
Telex 135 408 ILA

Dr. W. Ingold AG  
Industriezone Nord  
CH-8902 Urdorf-Zürich  
Schweiz  
Telefon 01 / 7 34 38 00